

Д.В. Гурьев<sup>1,2</sup>, А.А. Цишнатти<sup>1,3</sup>, С.М. Роднева<sup>1</sup>, Ю.А. Федотов<sup>1,2</sup>,  
Д.В. Молодцова<sup>1</sup>, Т.М. Блохина<sup>1,2</sup>, Е.И. Яшкина<sup>1,2</sup>, А.Н. Осипов<sup>1,2</sup>

## ОСОБЕННОСТИ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА ЛИНИИ HeLa, ВЫЖИВШИХ И ДАВШИХ УСТОЙЧИВЫЙ РОСТ ПОСЛЕ ОСТРОГО РЕНТГЕНОВСКОГО ОБЛУЧЕНИЯ

<sup>1</sup>Федеральный медицинский биофизический центр им. А.И. Бурназяна ФМБА России, Москва

<sup>2</sup>Федеральный исследовательский центр химической физики им. Н.Н. Семенова РАН, Москва

<sup>3</sup>Национальный исследовательский ядерный университет «МИФИ», Москва

Контактное лицо: Денис Владимирович Гурьев, e-mail: Denis.Guryev@gmail.com

### РЕФЕРАТ

**Цель:** Оценка эффективности репарации двунитевых разрывов (ДР) ДНК, пролиферативной активности и выхода цитогенетических нарушений в опухолевых клетках человека линии HeLa, выживших и давших устойчивый рост после острого облучения в дозе 15 Гр.

**Материал и методы:** В работе использовали линию опухолевых клеток человека HeLa (карцинома шейки матки). Облучение клеток проводили на рентгеновской биологической установке РУБ РУСТ-М1 (Россия), оснащенной двумя рентгеновскими излучателями, при мощности дозы 0,85 Гр/мин, напряжении 200 кВ, суммарном токе трубок 10 мА, фильтре 1,5 мм Al. Для получения клонов выживших клеток (HeLaRR), после острого облучения в дозе 15 Гр культуры клеток инкубировали в стандартных условиях CO<sub>2</sub>-инкубатора (37 °С, 5 % CO<sub>2</sub>) в течение нескольких недель до получения хорошо пролиферирующих клеток. Для количественной оценки остаточных (24 ч после облучения) фокусов репарации ДР ДНК использовали иммуноцитохимическое окрашивание фокусов фосфорилированного белка H2AX (γH2AX). Количество микроядер (МЯ) оценивали в цитохалазин-Б цитокinez-блокированных двуядерных клетках, окрашенных акридиновым оранжевым с помощью люминесцентной микроскопии. Время удвоения клеточной популяции анализировали по кривым роста клеток, полученным путем ежедневного подсчета клеток в течение пяти дней. Распределение по стадиям клеточного цикла оценивали методом проточной цитометрии с использованием красителя пропидий йодид. Все количественные показатели исследований обрабатывали с применением t-критерия Стьюдента для независимых выборок и критерия Колмогорова–Смирнова.

**Результаты:** В результате проведенных исследований выявлено, что острое облучение в высокой дозе ведет к селекции клеток с более высокой репаративной способностью, что подтверждается низким уровнем остаточных фокусов репарации ДР ДНК и МЯ после тестирующего облучения в дозах 5 и 10 Гр. Выявлено значительное снижение пролиферативной активности клеток, выживших после острого рентгеновского облучения в дозе 15 Гр. Время удвоения популяции необлученных клеток, находящихся на стадии экспоненциального роста, составило ~18 ч, тогда как для выживших после облучения в дозе 15 Гр клеток ~42 ч. Снижение пролиферативной активности сопровождалось изменением распределения по фазам клеточного цикла.

**Ключевые слова:** HeLa, γH2AX, микроядра, пролиферация, остаточные фокусы, двунитевые разрывы ДНК, рентгеновское излучение

**Для цитирования:** Гурьев Д.В., Цишнатти А.А., Роднева С.М., Федотов Ю.А., Молодцова Д.В., Блохина Т.М., Яшкина Е.И., Осипов А.Н. Особенности опухолевых клеток человека линии HeLa, выживших и давших устойчивый рост после острого рентгеновского облучения // Медицинская радиология и радиационная безопасность. 2022. Т. 67. № 4. С. 5–9. DOI:10.33266/1024-6177-2022-68-4-5-9

D.V. Guryev<sup>1,2</sup>, A.A. Tsishnatti<sup>1,3</sup>, S.M. Rodneva<sup>1</sup>, Yu.A. Fedotov<sup>1,2</sup>,  
D.V. Molodtsova<sup>1</sup>, T.M. Blokhina<sup>1,2</sup>, E.I. Yashkina<sup>1,2</sup>, A.N. Osipov<sup>1,2</sup>

## Peculiarities of Human Tumor HeLa Cells Surviving and Giving a Stable Growth After Acute X-ray Irradiation

<sup>1</sup>A.I. Burnasyan Federal Medical Biophysical Center, Moscow, Russia

<sup>2</sup>N.N. Semenov Federal Research Center for Chemical Physics, Moscow, Russia

<sup>3</sup>National Research Nuclear University MEPhI, Moscow, Russia

Contact person: D.V. Guryev, e-mail: Denis.Guryev@gmail.com

### ABSTRACT

**Purpose:** The evaluation of the repair efficiency of DNA double-strand breaks (DSB), proliferative activity and the yield of cytogenetic disorders in human tumor HeLa cells which survived and gave stable growth after acute irradiation at a dose of 15 Gy.

**Material and methods:** HeLa human tumor cell line (cervical carcinoma) was used. Cells were irradiated on an X-ray biological installation RUST-M1 (Russia), equipped with two X-ray emitters, at a dose rate of 0.85 Gy / min, a voltage of 200 kV, a total current of 10 mA, and a 1.5 mm Al filter. To obtain clones of surviving cells (HeLaRR), after acute irradiation at a dose of 15 Gy, cell cultures were incubated under standard CO<sub>2</sub> incubator conditions (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>) for several weeks until well proliferating cells were obtained. Immunocytochemical staining of the foci of the phosphorylated H2AX protein (γH2AX) was used to quantitatively evaluate the residual foci of DNA DSB repair.

The micronuclei number was assessed in cytochalasin-B cytokinesis-blocked binucleated cells stained with acridine orange with luminescence microscopy. The doubling time of the cell population was analyzed by the cell growth curves obtained by daily cell counting for five days. The cell cycle stages distribution was assessed by flow cytometry using the propidium iodide dye. All quantitative indicators of the studies were processed using the Student's t-test for independent samples and the Kolmogorov – Smirnov test.

**Results:** It was revealed that acute irradiation at a high dose leads to the selection of cells with a higher reparative capacity which is confirmed by the low yield of residual foci of DNA DSB repair and MN after testing irradiation at doses of 5 and 10 Gy. A significant decrease in the proliferative activity of cells that survived after acute X-ray irradiation at a dose of 15 Gy was revealed. The doubling time of the population of unirradiated cells at the stage of exponential growth was ~18 hours while for cells that survived after irradiation at a dose of 15 Gy ~42 hours. A change in the cell cycle phases distribution was observed.

**Conclusion:** Thus, acute irradiation at a high dose leads to the selection of cells with a higher reparative capacity which is confirmed by the low yield of residual  $\gamma$ H2AX foci and MN after testing irradiation at doses of 5 and 10 Gy. The decrease in proliferative activity was accompanied by a change in the cell cycle phases distribution.

**Keywords:** HeLa,  $\gamma$ H2AX, micronuclei, proliferation, residual foci, DNA double-strand breaks, X-ray

**For citation:** Guryev DV, Tsishnatti AA, Rodneva SM, Fedotov YuA, Molodtsova DV, Blokhina TM, Yashkina E.I., Osipov AN. Peculiarities of Human Tumor HeLa Cells Surviving and Giving a Stable Growth After Acute X-ray Irradiation. Medical Radiology and Radiation Safety. 2022;67(4):5–9. (In Russian). DOI:10.33266/1024-6177-2022-68-4-5-9

## Введение

Лучевая терапия на сегодняшний день является одним из основных способов лечения злокачественных новообразований, целью которой является достижение локального поражения опухоли с последующим предотвращением инвазии и появления метастазов. Однако наличие радиорезистентных клеток в гетерогенной опухолевой ткани остается одной из важнейших проблем в радиотерапии и химиолучевой терапии [1]. Гетерогенность популяции опухолевых клеток является результатом клонального разнообразия и может проявляться в неоднородности генетического и эпигенетического статусов, экспрессии генов и белков, морфологических и функциональных признаков (в том числе по чувствительности к радиационным и химическим воздействиям) [2, 3]. Вероятно, такое разнообразие является источником адаптации опухоли к меняющимся условиям микроокружения и изменения ее злокачественного потенциала, что приводит к возникновению клеточных клонов, различающихся не детерминированным набором признаков [4, 5].

В настоящее время особое внимание уделяют изучению особых опухолевых клеток, сходных со стволовыми клетками нормальных тканей по ряду функциональных и молекулярно-биологических особенностей [6, 7]. Эти клетки, получившие в литературе название опухолевых стволовых клеток (ОСК), обладают аномальной резистентностью к радиационным и химическим воздействиям [8, 9]. Предполагается, что именно ОСК отвечают за метастазирование злокачественных новообразований и посттерапевтические рецидивы [10].

Таким образом, гетерогенность опухолевых клеток во многом определяет эффективность лечения злокачественных новообразований и выяснение молекулярно-клеточных механизмов формирования их радиорезистентности не теряет своей актуальности уже многие годы.

Цель исследования – оценка эффективности репарации двунитевых разрывов (ДР) ДНК, пролиферативной активности и выхода цитогенетических нарушений в опухолевых клетках человека линии HeLa, выживших и давших устойчивый рост после острого облучения в дозе 15 Гр. Для этого были поставлены следующие задачи:

1. Получить жизнеспособные клоны клеток линии HeLa после острого рентгеновского облучения в дозе 15 Гр (HeLaRR);
2. Сравнить количественный выход остаточных фокусов белка-маркера ДР ДНК –  $\gamma$ H2AX и микроядер (МЯ) в клетках HeLa и HeLaRR после тестового облучения рентгеновским излучением в дозах 5 и 10 Гр;
3. Сравнить пролиферативную активность клеток HeLa и HeLaRR.

## Материал и методы

### Культура клеток и условия облучения

В работе использовали линию опухолевых клеток человека HeLa (карцинома шейки матки). Клетки культивировали в среде DMEM/F12 (Thermo Fisher Scientific, США), содержащей 10 % эмбриональной телячьей сыворотки (FBS, Thermo Fisher Scientific, США) и антибиотика пенициллин-стрептомицин (ООО НПП «ПанЭко», Россия) в стандартных условиях CO<sub>2</sub>-инкубатора (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>) со сменой среды один раз в три дня. При достижении 75–80 % конfluence, клетки снимали с пластика ферментативным путем. Облучение клеток проводили на рентгеновской биологической установке РУБ РУСТ-М1 (Россия), оснащенной двумя рентгеновскими излучателями, при мощности дозы 0,85 Гр/мин, напряжении 200 кВ, суммарном токе трубок 10 мА, фильтре 1,5 мм Al. Для получения клонов выживших клеток (HeLaRR), после острого облучения в дозе 15 Гр культуры клеток инкубировали в стандартных условиях CO<sub>2</sub>-инкубатора (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>) в течение нескольких недель до получения хорошо пролиферирующих клеток.

### Иммуноцитохимический анализ остаточных фокусов $\gamma$ H2AX

Для проведения анализа перед проведением экспериментов клетки пассировали на стерильные покровные стекла (18×18 мм, Thermo Fisher Scientific, США) в чашках Петри (d=35 мм, Corning, США) в 500 мкл клеточной суспензии из расчета 10×10<sup>4</sup> кл/мл. Инкубация перед облучением проводилась в стандартных условиях CO<sub>2</sub>-инкубатора (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>). Спустя 24 часа после облучения клетки на покровных стеклах фиксировали 4 % раствором параформальдегида в фосфатно-солевом буфере (pH 6,9) в течение 20 мин при комнатной температуре, после чего дважды промывали фосфатно-солевым буфером (pH 7,4). Пермеабилizировали 0,3 % Тритон-X100 в фосфатно-солевом буфере (pH 7,4), содержащем 2 % бычьего сывороточного альбумина для блокирования неспецифического связывания. Слайды инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре с первичными антителами (кроличьи моноклональные антитела к белку  $\gamma$ H2AX (Merck-Millipore, США) в разведении 1/200) в фосфатно-солевом буфере (pH 7,4), содержащем 1 % бычьего сывороточного альбумина. Затем слайды дважды промывали фосфатно-солевым буфером (pH 7,4), содержащем 0,1 % бычьего сывороточного альбумина, и инкубировали в темноте при комнатной температуре в течение 1 ч со вторичными антителами IgG (H+L), конъюгированными с флуорохромами (антитела козы к белкам кролика, конъюгированные с Rhodamine (Merck-Millipore, США), в разведении 1/400) в фосфатно-солевом буфере (pH 7,4), содержащем 1 % бычьего

сывороточного альбумина. Для окраски ДНК и предотвращения фотоблещивания использовали содержащую DAPI препятствующую фотоблещиванию среду ProLong Gold (Life Technologies, США). Визуализацию, документирование и обработку иммуноцитохимических микроизображений осуществляли на люминесцентном микроскопе Nikon Eclipse Ni-U (Nikon, Япония), оснащенном видеокамерой высокого разрешения ProgRes MFcool (Jenoptik AG, Германия) с использованием наборов светофильтров UV-2E/C (340–380 нм возбуждение и 435–485 нм эмиссия) и Y-2E/C (540–580 нм возбуждение и 600–660 нм эмиссия). Анализировали не менее 200 клеток на экспериментальную группу. Подсчет количества фокусов выполняли с использованием программы DAFI (<https://github.com/varnivey/darfi>).

### Цитогенетический анализ

Анализ уровня микроядер (МЯ) в цитокинез-блокированных клетках проводили в соответствии с методикой и рекомендациями [11]. После облучения клетки инкубировали в полной среде, содержащей цитохалазин-Б (Sigma, США) в концентрации 3 мкг/мл в течение 22–23 ч для блокировки цитокинеза и получения двуядерных клеток. После этого клетки снимали с флаконов ферментативно, инкубировали в гипотоническом растворе KCl (0,75 mM) при 37 °C в течение 15 мин и фиксировали в холодном растворе метанол-уксусной кислоты в соотношении 3:1. Далее получали препараты, которые окрашивали акридиновым оранжевым. Подсчет МЯ осуществляли на люминесцентном микроскопе Nikon Eclipse Ni-U (Nikon, Япония), оснащенном видеокамерой высокого разрешения ProgRes MFcool (Jenoptik AG, Германия). В каждой группе анализировали не менее 1000 цитокинез-блокированных двуядерных клеток, причем учитывали наличие одного, двух, трех и более трех МЯ на клетку.

### Кривые роста

Для сравнительной оценки времени удвоения клеточной популяции облученных и необлученных опухолевых клеток проводили количественный анализ кривых роста в течение 5 сут. Для этого клетки каждой экспериментальной группы высаживали в культуральные флаконы с площадью роста 25 см<sup>2</sup> в концентрации 100×10<sup>3</sup> клеток на флакон. Спустя 24 ч и в последующие 5 сут клетки переводили в суспензию ферментативным путем и подсчитывали в камере Горяева ежедневно 2 раза в день с интервалом в 6 ч. На основании полученных данных строили кривые роста клеточной популяции.

### Проточная цитометрия

Клетки на стадии экспоненциального роста снимали с культуральных флаконов ферментативным путем. Суспензию клеток в количестве 1×10<sup>6</sup> на экспериментальную группу ресуспендировали в холодном фосфатно-солевом буфере. Далее клетки фиксировали в 70 % ледяном этаноле и хранили при –20 °C до выполнения анализа. Для проведения анализа клетки дважды отмывали в фосфатно-солевом буфере (рН 7,4) и ресуспендировали в растворе, содержащем пропидий йодид (0,5 мг/мл) и РНК-азу, затем инкубировали при 37 °C в течение 30 мин. Клетки анализировали на проточном цитометре BD FACSCalibur (Becton Dickinson, San Jose, CA, США). Для каждого образца было зарегистрировано в общей сложности 50 тыс событий и проанализировано процентное содержание клеток в различных фазах клеточного цикла с использованием программного обеспечения BD CellQuest Pro 5.1 (Becton Dickinson, San Jose, CA, США).

### Статистический анализ

Статистическую обработку осуществляли с использованием программ Microsoft Excel 2019 и Statistica 10,0.

Все количественные показатели исследования обрабатывали с применением t-критерия Стьюдента для независимых выборок и критерия Колмогорова–Смирнова. Различия сравниваемых результатов ( $M \pm m$ , где  $M$  – выборочное среднее арифметическое,  $m$  – погрешность среднего арифметического) считались достоверными при достигнутом уровне значимости  $p < 0,05$ .

### Результаты и обсуждение

В результате проведенных исследований были получены клетки, выжившие после острого рентгеновского облучения в дозе 15 Гр (сублиния HeLaRR). После их культивирования в течение 20 сут, клетки подвергали тестовому рентгеновскому облучению в дозах 5 и 10 Гр. Оценивали количество остаточных (спустя 24 ч после облучения) фокусов  $\gamma$ H2AX, число МЯ в цитохалазин-Б цитокинез-блокированных двуядерных клетках, а также время удвоения на основе кривых роста популяций клеток линий HeLa и HeLaRR без дополнительного облучения.

Выявлено значительное снижение количества остаточных фокусов  $\gamma$ H2AX в клетках линии HeLaRR после тестового облучения в дозах 5 и 10 Гр по сравнению с линией HeLa (рис. 1). Регрессия зависимости количества остаточных фокусов от дозы рентгеновского излучения для обеих линий описывается линейной функцией: для линии HeLa  $y = 2,21x + 2,79$  ( $R^2 = 0,99$ ), для линии HeLaRR  $y = 0,76x + 1,00$  ( $R^2 = 0,99$ ). Наблюдаемые различия, полагаем, связаны с более эффективной репарацией ДР ДНК в клетках, выживших и давших устойчивый рост после острого облучения в дозе 15 Гр. Известно, что остаточные фокусы белков репарации ДР ДНК могут присутствовать в течение длительного времени (более 24 ч) после своего образования и, по всей видимости, представляют собой сайты как нерепарируемых, так и медленно репарируемых повреждений ДНК [12–14]. Показано, что количество остаточных фокусов  $\gamma$ H2AX тесно ассоциировано с клеточной гибелью и цитогенетическими нарушениями [15, 16]. Кроме того, существуют экспериментальные доказательства, что фокусы  $\gamma$ H2AX способны передаваться следующему клеточному поколению через митоз и служить своеобразным индикатором накопления генетических нарушений [17].

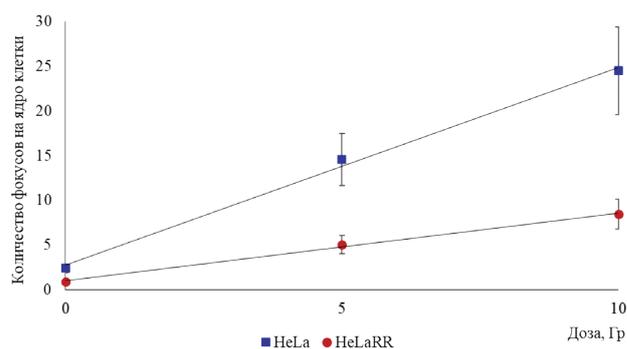


Рис. 1. Зависимости количества остаточных фокусов  $\gamma$ H2AX от дозы рентгеновского излучения в клетках HeLa и HeLaRR

Fig. 1. Dependence of the residual  $\gamma$ H2AX foci number of X-ray dose in HeLa and HeLaRR cells

Количественный анализ выхода МЯ в клетках линий HeLa и HeLaRR после тестового дополнительного рентгеновского облучения в дозах 5 и 10 Гр показал, что в клетках, выживших после облучения в дозе 15 Гр (HeLaRR) и дополнительно облученных в дозах 5 и 10 Гр, количество МЯ статистически значимо ниже по сравнению с клетками HeLa (рис. 2). Фоновое количе-

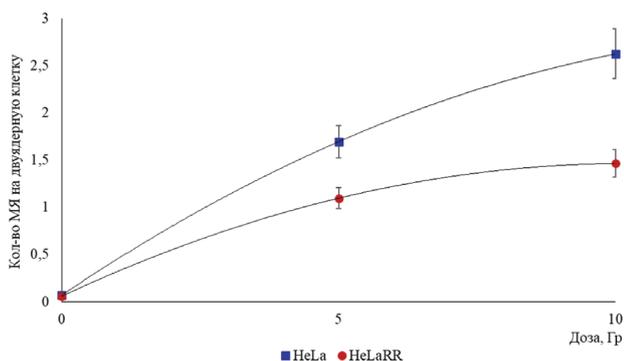


Рис. 2. Зависимости среднего количества МЯ от дозы рентгеновского излучения в цитохалазин-В блокированных двуядерных клетках HeLa и HeLaRR

Fig. 2. Dependence of the MN mean number of the X-ray dose in cytochalasin-B blocked binucleated HeLa and HeLaRR cells

ство МЯ в обеих клеточных линиях статически не различалось. Среднее количество МЯ на одну двуядерную клетку от дозы облучения имеет регрессионную полиномиальную зависимость для всех экспериментальных групп:  $y = -0,01x^2 + 0,39x + 0,07$  ( $R^2 = 1$ , HeLa) и  $y = -0,01x^2 + 0,27x + 0,06$  ( $R^2 = 1$ , HeLaRR). Кроме среднего количества МЯ на клетку, были получены данные по их количественному распределению, а именно, было подсчитано количество клеток без МЯ и содержащих одно, два, три и более трех МЯ (рис. 3). Не было выявлено различий по этому показателю в клетках обеих линий без тестового облучения (рис. 3, А). После тестового облучения в дозах 5 и 10 Гр в клетках линии HeLaRR выявлено статистически значимое увеличение количества клеток без МЯ и снижение количества клеток с более, чем тремя МЯ (рис. 3Б, В). После тестового облучения в дозе 5 Гр у этой же линии выявлено снижение клеток с одним МЯ, а после облучения в дозе 10 Гр их увеличение (рис. 3Б, В), где различия были статистически достоверны. В целом, в выживших клетках после острого рентгеновского облучения в дозе 15 Гр и испытавших дополнительное радиационное воздействие в дозах 5 и 10 Гр показано снижение выхода как остаточных фокусов репарации ДР ДНК, так и МЯ. Полагают, что снижение количества МЯ после воздействия ионизирующего излучения характерно для радиорезистентных клонов опухолевых клеток, однако в некоторых исследованиях это утверждение подвергают сомнению и эффекты зависят от клеточной линии [18, 19].

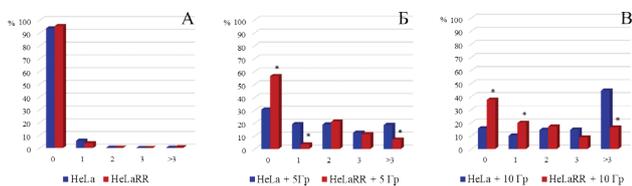


Рис. 3. Распределение клеток HeLa и HeLaRR по количеству МЯ (ось абсцисс) без тестирующего облучения (А) и после тестирующего облучения в дозах 5 Гр (Б) и 10 Гр (В)

Fig. 3. Distribution of HeLa and HeLaRR cells by the MN number (abscissa axis) without test irradiation (A) and after testing irradiation at doses of 5 Gy (B) and 10 Gy (B)

Также нами был проведен тест на клоногенную способность линий HeLa и HeLaRR после тестового облучения рентгеновским излучением в поглощенных дозах 5 и 10 Гр, однако значимых различий выявлено не было. По всей видимости, результаты свидетельствуют о селекции

клеток с более высокой репаративной способностью после радиационного воздействия в высоких дозах, которые в дальнейшем при культивировании формируют исходную гетерогенную популяцию, имеющую клоногенный потенциал предварительно необлученных клеток.

Для сравнительной оценки пролиферативной активности необлученных и выживших после острого облучения в поглощенной дозе 15 Гр клеток, нами была проведена оценка времени удвоения клеточной популяции на основе кривых роста (рис. 4). Выявлено значительное уменьшение этого показателя для клеток линии HeLaRR. Время удвоения популяции необлученных клеток, находящихся на стадии экспоненциального роста, составило ~18 ч, тогда как для клеток линии HeLaRR ~42 ч. Полагая, что снижение пролиферативной активности связано с задержками в сверочных точках клеточного цикла, был проведен анализ распределения клеток обеих экспериментальных групп по стадиям клеточного цикла. Показано, что в выжившей после острого рентгеновского облучения в поглощенной дозе 15 Гр популяции клеток значительно возрастает доля клеток, находящихся на стадии G<sub>2</sub>/M клеточного цикла (рис. 5). Именно в этой сверочной точке клеточного цикла клетка не приступает к делению, пока поврежденная или неполностью отрепарированная молекула ДНК не будет полностью восстановлена. В случае неуспешного восстановления от повреждений и дальнейшего деления запускается механизм клеточной гибели. Аналогичные результаты были получены Liu С. и соавт. ранее на некоторых линиях опухолевых клеток [20], причем доля клеток в G<sub>2</sub>/M стадии клеточного цикла растет со временем после облучения и зависит от клеточной линии. Авторы утверждают, что это является индикатором повышения радиорезистентности.

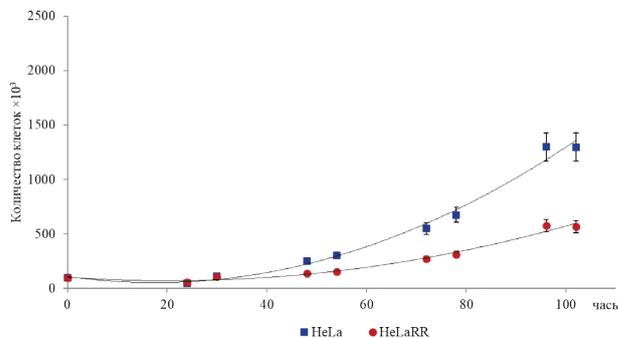


Рис. 4. Кривые роста клеток линий HeLa и HeLaRR

Fig. 4. Growing curves of HeLa and HeLaRR cell lines

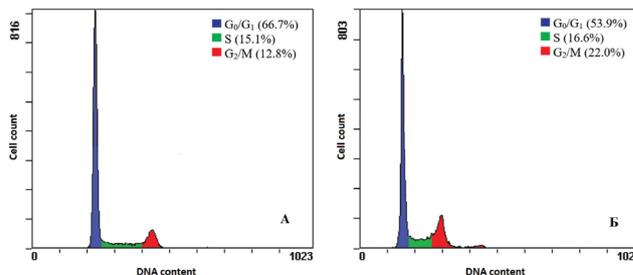


Рис. 5. Данные проточной цитометрии по распределению экспоненциально растущих клеток линий HeLa (А) и HeLaRR (Б) по стадиям клеточного цикла

Fig. 5. Flow cytometry data on cell cycle stages distribution in exponentially growing HeLa (A) and HeLaRR (B) cell lines

Таким образом, в результате проведенных исследований выявлено, что острое облучение в высокой дозе ведет к селекции клеток с более высокой репаративной способностью, что подтверждается более низким выходом остаточных фокусов репарации ДР ДНК и МЯ по-

сле тестового облучения в дозах 5 и 10 Гр. У выживших и давших устойчивый рост после острого облучения в дозе 15 Гр клеток отмечено снижение пролиферативной активности и изменение распределения по фазам клеточного цикла.

## REFERENCES

- Dean M., Fojo T., Bates S.. Tumour Stem Cells and Drug Resistance. *Nat. Rev. Cancer.* 2005;5;4:275-284.
- Alhaddad L., Pustovalova M., Blokhina T., Chuprov-Netochin R., Osipov A.N., Leonov S. IR-Surviving NSCLC Cells Exhibit Different Patterns of Molecular and Cellular Reactions Relating to the Multifraction Irradiation Regimen and p53-Family Proteins Expression. *Cancers.* 2021;13;11:2669.
- Pustovalova M., Alhaddad L., Smetanina N., Chigasova A., Blokhina T., Chuprov-Netochin R., et al. The p53-53BP1-Related Survival of A549 and H1299 Human Lung Cancer Cells after Multifractionated Radiotherapy Demonstrated Different Response to Additional Acute X-ray Exposure. *International Journal of Molecular Sciences.* 2020;21;9:3342.
- Almendro V., Marusyk A., Polyak K. Cellular Heterogeneity and Molecular Evolution in Cancer. *Annu. Rev. Pathol.* 2013;8:277-302.
- De Sousa E.M.F., Vermeulen L., Fessler E., Medema J.P. Cancer Heterogeneity-a Multifaceted View. *EMBO Rep.* 2013;14;8:686-695.
- Butof R., Dubrovskaya A., Baumann M.. Clinical Perspectives of Cancer Stem Cell Research in Radiation Oncology. *Radiother Oncol.* 2013;108;3:388-396.
- Peitzsch C., Kurth I., Kunz-Schughart L., Baumann M., Dubrovskaya A.. Discovery of the Cancer Stem Cell Related Determinants of Radioresistance. *Radiother Oncol.* 2013;108;3:378-387.
- Krause M., Dubrovskaya A., Linge A., Baumann M. Cancer Stem Cells: Radioresistance, Prediction of Radiotherapy Outcome and Specific Targets for Combined Treatments. *Adv. Drug. Deliv. Rev.* 2017;109:63-73.
- Pustovalova M., Alhaddad L., Blokhina T., Smetanina N., Chigasova A., Chuprov-Netochin R., et al. The CD44<sup>high</sup> Subpopulation of Multifraction Irradiation-Surviving NSCLC Cells Exhibits Partial EMT-Program Activation and DNA Damage Response Depending on Their p53 Status. *International Journal of Molecular Sciences.* 2021;22;5:2369.
- Peitzsch C., Tyutyunnykova A., Pantel K., Dubrovskaya A. Cancer Stem Cells: The Root of Tumor Recurrence and Metastases. *Semin Cancer Biol.* 2017;44:10-24.
- International Atomic Energy Agency. *Cytogenetic Analysis for Radiation Dose Assessment: a Manual.* Vienna, International Atomic Energy Agency, 2001. 127 p.
- Siddiqui M.S., Francois M., Fenech M.F., Leifert W.R. Persistent GammaH2AX: A Promising Molecular Marker of DNA Damage and Aging. *Mutat. Res. Rev. Mutat. Res.* 2015;766:1-19.
- Sorokin M., Kholodenko R., Grekhova A., Suntsova M., Pustovalova M., Vorobyeva N., et al. Acquired Resistance to Tyrosine Kinase Inhibitors May be Linked with the Decreased Sensitivity to X-Ray Irradiation. *Oncotarget.* 2017;9;4:5111-5124.
- Babayana N., Vorobyeva N., Grigoryan B., Grekhova A., Pustovalova M., Rodneva S., et al. Low Repair Capacity of DNA Double-Strand Breaks Induced by Laser-Driven Ultrashort Electron Beams in Cancer Cells. *International Journal of Molecular Sciences.* 2020;21;24:9488.
- Ban ath J.P., Klovov D., MacPhail S.H., Banuelos C.A., Olive P.L. Residual  $\gamma$ H2AX Foci as an Indication of Lethal DNA Lesions. *BMC Cancer.* 2010;10;1.
- Raavi V., Perumal V., Paul S.F.D. Potential Application of  $\gamma$ -H2AX as a Biodosimetry Tool for Radiation Triage. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research.* 2021;787:108350.
- Vaurijoux A., Voisin P., Freneau A., Barquinero J.F., Gruel G. Transmission of Persistent Ionizing Radiation-Induced Foci Through Cell Division in Human Primary Cells. *Mutat Res.* 2017;797-799:15-25.
- Akudugu J.M., Theron T., Serafin A.M., Bohm L. Influence of DNA Double-Strand Break Rejoining on Clonogenic Survival and Micronucleus Yield in Human Cell Lines. *Int. J. Radiat. Biol.* 2004;80;2:93-104.
- Akudugu J.M., Bohm L. Micronuclei and Apoptosis in Glioma and Neuroblastoma Cell Lines and Role of Other Lesions in the Reconstruction of Cellular Radiosensitivity. *Radiat Environ Biophys.* 2001;40;4:295-300.
- Liu C., Nie J., Wang R., Mao W. The Cell Cycle G2/M Block Is an Indicator of Cellular Radiosensitivity. *Dose-Response.* 2019;17;4:155932581989100.

**Конфликт интересов.** Все авторы внесли одинаковый вклад в концепцию, дизайн, проведение, обработку данных исследования и создание текста статьи.

**Финансирование.** Работа была выполнена по ГЗ НИР «Разработка подходов к снижению радиорезистентности опухолевых стволовых клеток», номер ЕГИСУ НИОКТР АААА-А19-119122000097-6.

**Участие авторов.** Статья подготовлена с равным участием авторов.

**Поступила:** 17.01.2022. **Принята к публикации:** 15.03.2022.

**Conflict of interest.** All authors made the same contribution to the conception, design, conduction, data analysis of the investigation and the creation of the text of the article.

**Financing.** The work was conducted by the research state task «Development of approaches to reduce the radioresistance of tumor stem cells» (АААА-А19-119122000097-6).

**Contribution.** Article was prepared with equal participation of the authors.

**Article received:** 17.01.2022. **Accepted for publication:** 15.03.2022.